



## The Ror1 receptor tyrosine kinase plays a critical role in regulating satellite cell proliferation during regeneration of injured muscle

Kamizaki, Koki

---

(Degree)

博士（医学）

(Date of Degree)

2020-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第7715号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1007715>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



## 学位論文の内容要旨

The Ror1 receptor tyrosine kinase plays a critical role in regulating satellite cell proliferation during regeneration of injured muscle

受容体型チロシンキナーゼ Ror1 は損傷筋の再生における衛星細胞の増殖制御に重要な役割を担う。

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻

細胞生理学

(指導教員：南 康博 教授)

紙崎 孝基

骨格筋は再生能の高い組織のひとつであり、再生過程では骨格筋特異的な組織幹細胞である衛星細胞が必須の役割を担う。通常、衛星細胞は静止期状態にあるが、骨格筋損傷後には炎症性サイトカインや増殖因子などに応答し増殖を開始する。続けて分化・融合することで新たな筋線維を形成し骨格筋の再生に寄与する。また、加齢に伴い骨格筋が萎縮するサルコベニアや、筋ジストロフィーなどでは衛星細胞の増殖・分化能の低下が見られることから、骨格筋疾患と衛星細胞の機能制御の関連性が示唆されつつある。これらのことから、衛星細胞の機能制御メカニズムの解明は重要な課題であるが、依然として不明な点が多い。

我々はこれまでに、Ror ファミリー受容体型チロシンキナーゼ Ror1 および Ror2 が発生過程における組織・器官形成に重要な役割を担うことを見出してきた。しかし、成体組織における Ror1, Ror2 の機能についてはほとんど未解明であった。我々はマウスの前脛骨筋へのカルディオトキシン投与による骨格筋損傷モデルマウスを用いて骨格筋損傷後に変動する遺伝子について調べたところ、*TNF-α* や *IL-1β* など炎症性サイトカインの発現上昇に加えて、*Ror1* および *Ror2* の発現も上昇することを見出した。このことから、Ror1, Ror2 は成体骨格筋の再生過程において重要な役割を担っている可能性が考えられた。そこで、我々は骨格筋再生における Ror ファミリー受容体型チロシンキナーゼの機能を明らかにしたいと考えた。

まず、骨格筋損傷後の *Ror1* および *Ror2* の発現誘導メカニズムについて検討するにあたって、骨格筋再生過程において *TNF-α* および *IL-1β* の発現上昇が *Ror1* および *Ror2* の発現上昇に先行していたことから、*TNF-α* および *IL-1β* が *Ror1*, *Ror2* の発現を誘導する可能性を考えた。そこで、*TNF-α* および *IL-1β* に対する中和抗体をカルディオトキシンとともにマウスの前脛骨筋に投与し、骨格筋損傷後の *Ror1* および *Ror2* の発現レベルについて qRT-PCR 法を用いて検討した。その結果、中和抗体の投与によって骨格筋損傷後の *Ror1* および *Ror2* の発現上昇が抑制された。このことから、*TNF-α* および *IL-1β* が骨格筋損傷後の *Ror1* および *Ror2* の発現を誘導する可能性が示された。

さらに、FACS を用いてマウスの骨格筋から衛星細胞を単離し発現解析を行ったところ、衛星細胞において *Ror1* が高発現していることを見出した。さらに、骨格筋損傷後の衛星細胞で *Ror1* の発現が増強されることを見出した。一方で骨格筋損傷前後の衛星細胞集団では *Ror2* は殆ど発現していないかった。そこで、今回は骨格筋の再生に必須の役割を担っている衛星細胞において高発現している *Ror1* の機能に着目した解析を行うこととした。

衛星細胞における *Ror1* の発現誘導メカニズムの解明を目的として、マウス筋芽細胞株である C2C12 細胞を用いた解析を行った。まず、C2C12 細胞に *TNF-α* および *IL-1β* を添加したところ、*Ror1* の発現量が上昇することを見出した。さらに NF-κB 阻害剤である PDTC を添加することで *TNF-α* 刺激による *Ror1* の発現誘導が抑制されることが確認された。また、ルシフェラーゼアッセイを行った結果、*Ror1* プロモーターの 500-1000bp 上流

領域に TNF- $\alpha$ 刺激依存的な *Ror1* の発現誘導に重要な領域が存在することを明らかにした。また、データベースを用いた解析から、*Ror1* プロモーター上には NF- $\kappa$ B シグナルの下流転写因子である p65 結合配列が複数存在することを明らかにした。さらに、クロマチン免疫沈降の結果から TNF- $\alpha$ 刺激依存的に p65 がそれらの結合配列に結合することが示された。これらのことから、骨格筋損傷後には TNF- $\alpha$ および IL-1 $\beta$ が NF- $\kappa$ B 経路を介して直接的に *Ror1* の発現を誘導している可能性が示唆された。

次に、骨格筋再生における *Ror1* の機能解析を行うために、衛星細胞特異的に *Ror1* を欠失することのできる *Ror1* コンディショナルノックアウトマウス (*Ror1* cKO; *Ror1*<sup>fl/fl</sup>, *Pax7CreERT2/+*) を作製した。タモキシフェン投与後に衛星細胞における *Ror1* の発現が抑制されることを確認した上で、コントロールマウス (*Ror1*<sup>fl/fl</sup>) および *Ror1* cKO マウスの前脛骨筋にカルディオトキシンを投与し、骨格筋損傷後の衛星細胞数の変動についてフローサイトメトリー法を用いて解析した。その結果、*Ror1* cKO マウスでは骨格筋損傷後の衛星細胞の増殖が抑制されることが確認された。また、免疫蛍光染色法を用いた解析からも、*Ror1* cKO マウスで骨格筋損傷後の衛星細胞の数が減少することが確認された。さらに、骨格筋損傷 2 週間後の筋線維径を計測したところ、*Ror1* cKO マウスではコントロールマウスに比べて筋線維径が小さいことが確認された。これは骨格筋再生能の低下を示す表現型のひとつであることから、*Ror1* は骨格筋損傷後の衛星細胞の増殖を促進することで骨格筋再生に寄与している可能性が示唆された。実際に、TNF- $\alpha$ および IL-1 $\beta$ の中和抗体をカルディオトキシンとともに前脛骨筋に投与した際、衛星細胞の数が減少することが確認された。さらに、C2C12 細胞に TNF- $\alpha$ を添加すると Ki67 陽性の増殖性細胞数が増加するが、siRNA を用いて *Ror1* の発現を抑制すると TNF- $\alpha$ 刺激による増殖促進が抑制されることが確認された。

以上の結果から、本研究は骨格筋損傷後に上昇する炎症性サイトカイン TNF- $\alpha$  および IL-1 $\beta$ が NF- $\kappa$ B 経路を介して衛星細胞における *Ror1* の発現を誘導し、*Ror1* は衛星細胞の増殖に対して促進的ではなくことで、骨格筋の再生に寄与していることが示された。衛星細胞の機能低下はサルコベニアなどの筋疾患の病態に関与していることが示唆されており、*Ror1* による衛星細胞の機能制御機構の解明は筋疾患の予防・治療法の開発においても重要である可能性が考えられる。

神戸大学大学院医学(系)研究科 (博士課程)

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第2932号	氏名	紙崎 孝基
論文題目 Title of Dissertation	<p>The Ror1 receptor tyrosine kinase plays a critical role in regulating satellite cell proliferation during regeneration of injured muscle</p> <p>受容体型チロシンキナーゼ Ror1 は損傷筋の再生における衛星細胞の増殖制御に重要な役割を担う</p>		
審査委員 Examiner	<p>主査 Chief Examiner 伊藤 達也</p> <p>副査 Vice-examiner 金木 乾</p> <p>副査 Vice-examiner 木田 亮</p>		
(要旨は1,000字~2,000字程度)			

骨格筋特異的な組織幹細胞である衛星細胞は、骨格筋損傷に応答して増殖した後、分化・融合することで新たな筋線維を形成し骨格筋の損傷部位を修復する。このため、衛星細胞は骨格筋再生に必須の役割を担うと考えられているが、その制御の分子メカニズムについては未だ不明な点が多い。

本研究では、まずマウスの前脛骨筋へのカルディオトキシン投与による骨格筋損傷モデルを用いた解析から、骨格筋損傷後に *Ror1* および *Ror2* の発現が上昇することを見出した。また、カルディオトキシンとともに TNF- $\alpha$  および IL-1 $\beta$  に対する中和抗体をマウスの前脛骨筋に投与し、骨格筋損傷後の *Ror1* および *Ror2* の発現について qRT-PCR 法を用いて検討したところ、骨格筋損傷後の *Ror1* および *Ror2* の発現上昇が抑制された。このことから、骨格筋再生過程では TNF- $\alpha$  および IL-1 $\beta$  が *Ror1* および *Ror2* の発現を誘導することが示された。

また、FACS を用いた解析から *Ror1* は衛星細胞において選択的に高発現していることを見出した。さらに、骨格筋損傷後の衛星細胞で *Ror1* の発現が増強されることを見出した。一方、*Ror2* は衛星細胞で殆ど発現していないかった。そこで、骨格筋再生過程の衛星細胞における *Ror1* の発現誘導メカニズムおよびその機能に着目した解析を行った。

まず、*Ror1* の発現誘導メカニズムの解明を目的として、マウス筋芽細胞株である C2C12 細胞を用いて解析した。C2C12 細胞に TNF- $\alpha$  および IL-1 $\beta$  を添加したところ、*Ror1* の発現量が上昇することを見出した。さらに NF- $\kappa$ B 経路の阻害剤である PDTC を添加することにより TNF- $\alpha$  刺激による *Ror1* の発現誘導が抑制されることが確認された。また、データベースを用いた解析から、*Ror1* プロモーター上には NF- $\kappa$ B シグナルの転写因子である p65 の結合配列が複数存在することが見出された。さらに、クロマチン免疫沈降の結果から TNF- $\alpha$  刺激依存的に p65 がそれらの結合配列に結合することが示された。また、ルシフェラーゼアッセイを行った結果、*Ror1* プロモーターの 500-1000bp 上流領域に TNF- $\alpha$  刺激依存的な *Ror1* の発現誘導に重要な領域が存在することを明らかにした。これらのことから、骨格筋損傷後には TNF- $\alpha$  および IL-1 $\beta$  が NF- $\kappa$ B 経路を介して直接的に *Ror1* の発現を誘導している可能性が示唆された。

次に、骨格筋再生における *Ror1* の機能解析を行うために、衛星細胞特異的に *Ror1* を欠失させることができる *Ror1* コンディショナルノックアウトマウス (*Ror1* cKO: *Ror1*<sup>fl/fl</sup>, *Pax7*<sup>CreERT2/+</sup>) を作製した。コントロールマウス (*Ror1*<sup>fl/fl</sup>) および *Ror1* cKO マウスの前脛骨筋にカルディオトキシンを投与し、骨格筋損傷後の衛星細胞数の変動についてフローサイトメトリー法および免疫蛍光染色法を用いて解析した。その結果、*Ror1* cKO マウスでは骨格筋損傷後の衛星細胞の増殖が減弱することが確認された。また、骨格筋損傷 2 週間後の筋線維径を計測したところ、*Ror1* cKO マウスではコントロールマウスに比べて筋線維径が小さいことが確認された。これは骨格筋再生能の低下を示す表現型のひとつであることから、*Ror1* は骨格筋損傷後の衛星細胞の増殖を促進することで骨格筋再生に寄与している可能性が示唆された。

以上から、本研究により骨格筋損傷後に誘導される炎症性サイトカイン TNF- $\alpha$  および IL-1 $\beta$ が NF- $\kappa$ B 経路を介して衛星細胞における *Ror1* の発現を誘導し、*Ror1* は衛星細胞の増殖を促進することにより、骨格筋の再生に寄与していることが示された。

本研究は、骨格筋組織幹細胞である衛星細胞において受容体型チロシンキナーゼ *Ror1* が選択的に発現しており、骨格筋損傷に伴い產生される炎症性サイトカインにより NF- $\kappa$ B 経路を介してその発現が増強し、その結果、衛星細胞の増殖が促進することを初めて明らかにしたものであり、骨格筋損傷修復における *Ror1* の機能について重要な知見を得たものとして価値ある業績と認める。よって、本研究者は博士（医学）の学位を得る資格があると認める。